نشریه پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد ۱، شماره ۱، صفحه ۷۵-۶۵، نیمه اول ۱۳۸۹

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 1, No. 1, 2010, p. 65-75

مهندسی ژنتیک نخود (*Cicer arietinum* L.) برای افزایش مقاومت به آفت پیله‌خوار (*Helicoverpa armigera*)

نسرین مشتاقی[1*]، عبدالرضا باقری[1]، تی جی هیگینز[2]، مختار جلالی جواران[3] و بهزاد قره‌یاضی[4]

۱- اعضای هیأت علمی دانشکده‌ی کشاورزی و پژوهشکده‌ی علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد
۲- عضو هیأت علمی مرکز تحقیقاتی CSIRO، کانبرا، استرالیا
۳- عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهران
۴- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۰۲/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۷/۱۸

چکیده

آفت پیله‌خوار، یکی از عوامل اصلی کاهش عملکرد نخود است که سالانه خسارت زیادی به محصول نخود وارد می‌کند. بنابراین، اصلاح این گیاه جهت افزایش مقاومت به این آفت، حایز اهمیت است. به همین منظور از ژن تغییریافته‌ی پروتئین کریستالی *cry1Ac* از باسیلوس تورینجینسیس در پلاسمید pCry1Ac-nptII حاوی دو T-DNA مجزا به منظور تراریزش گیاه نخود استفاده شد. در نهایت پس از گزینش‌های متوالی، ۳۸ گیاه حاوی ژن *nptII* به‌دست آمد که در بین آنها ۳۶ گیاه حاوی ژن *cry1Ac* و دو گیاه به تنهایی ژن *nptII* را داشتند. از ۳۶ گیاه حاوی ژن *cry1Ac*، ۳۰ گیاه این ژن را بیان و سم Cry1Ac را تولید نمودند. درصد تراریزش در این بررسی ۰/۳۷ درصد برآورد شد. از این تعداد گیاه تراریخته، تنها هفت گیاه تولید بذر نموده و نسل T1 را ایجاد کردند. با انجام آزمون‌های وسترن بلاتینگ و PCR برای گیاهان نسل T0 و T1، گیاهان از نظر میزان تولید پروتئین Cry1Ac در گروه‌هایی با بیان بالا، متوسط و ضعیف قرار گرفتند. نتایج مقدماتی زیست‌سنجی بر روی لارو این آفت نشان داد که لاین‌های با بیان بالای پروتئین Cry1Ac باعث کشندگی ۱۰۰ درصد لاروهای این آفت می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: آفت پیله‌خوار، تراریزش نخود، Bt، *cry1Ac*

مقدمه

انتقال ژن به نخود با هدف افزایش مقاومت به برخی تنش‌های زیستی مانند آفت پیله‌خوار نخود و تنش‌های غیرزیستی، از اهداف اصلاحی مدنظر در این گیاه زراعی می‌باشد. میزان خسارت آفت پیله‌خوار نخود در جهان سالانه بالغ بر ۳۲۵ میلیون دلار تخمین زده شده است که در ایران میزان این خسارت در برخی مناطق حدود ۲۰ درصد می باشد (Popelka & Higgins, 2007). لذا افزایش مقاومت در برابر این آفت می‌تواند سبب بهبود عملکرد این گیاه در نواحی کاشت آن شود. یکی از راهبردهای مؤثر برای تولید نخود تراریخته مقاوم به آفت پیله‌خوار، استفاده از سموم طبیعی Cry از باکتری باسیلوس تورینجینسیس (*Bacillus thuringiensis*) است. این سموم قادرند در معده حشرات فعال شده و سیستم گوارشی حشره را مختل نمایند.

تاکنون سه گزارش از نخود تراریخته حاوی ژن‌هایی جهت مقاومت در برابر آفات ارائه شده است. اولین مورد آن مربوط به نخود تراریخته‌ای است که به روش تفنگ ژنی و با انتقال ژن *cry1Ac* تولید شده است (Kar *et al.*, 1997). ارزیابی‌های زیستی اولیه این محققان مؤید کنترل مؤثر آفت پیله‌خوار نخود توسط این گیاهان تراریخته بوده است. همچنین حضور این ژن در نسل T1 نیز مورد تأئید قرار گرفته است. در گزارش دوم، از آگروباکتریوم برای انتقال ژن بازدارنده آلفاآمیلاز از لوبیای معمولی به نخود استفاده شده است (Sarma *et al.*, 2004). در این بررسی، انتقال و بیان پایدار ژن مورد نظر در نسل‌های بعدی نیز تأئید شده است. بیان بالای ژن بازدارنده آلفاآمیلاز در این گیاهان به شدت مانع رشد آفات انباری مانند سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات (*Callosobruchus maculatus*) و سوسک چینی حبوبات

* **نویسنده مسئول:** مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و بِه‌نژادی گیاهی، تلفن: ۸۷۹۵۶۱۶-۰۵۱۱
پُست الکترونیک: moshtaghi@um.ac.ir

(*C. chinensis*) گردیده است. در مطالعه سوم، (Sanyal *et al.*, 2005) نیز با انتقال ژن *cry1Ac* به نخود و بیان پایدار آن در نسل‌های T0 و T1 توانستند لارو آفت *H. armigera* را در ارزیابی‌های زیستی کنترل کنند. در بررسی‌های مختلف از کانامایسین با غلظت‌های بین ۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای گزینش گیاهان تراریخته نخود استفاده شده است. اما شواهد نشان داده است که گزینش در مقدار کمتر کانامایسین منجر به فرار بیشتر شاخه‌های غیرتراریخته می‌شود (Fontana *et al.*, 1993; Polowick *et al.*, 2004; Sarma *et al.*, 2004; Sanyal *et al.*, 2005).

در این بررسی از ژن *cry1Ac* و ژن *nptII* در یک ساختار پلاسمیدی با دو T-DNA جداگانه استفاده شده است تا ضمن انتقال ژن *cry1Ac*، بتوان ژن گزینش‌گر مقاوم به آنتی‌بیوتیک را در نسل‌های بعد حذف نمود. علاوه بر این، ژن *cry1Ac* تحت کنترل یک پیش‌بر اختصاصی قرار داده شده است تا بیان آن تنها در بافت‌های سبز گیاه که در معرض حمله آفت قرار دارند، مشاهده شود. بنابراین می توان امیدوار بود در نسل‌های بعد به لاین مطلوبی جهت کنترل جمعیت این آفت دست یافت.

مواد و روش‌ها

باکتری و پلاسمید

در این طرح از باکتری آگروباکتریوم تومی فاشینس (*Agrobacterium tumefaciens*) نژاد AGL1 استفاده شد. این باکتری حاوی پلاسمید pCry1Ac-nptII (تهیه شده از CSIRO کشور استرالیا) می‌باشد که ژن *nptII* به عنوان ژن گزینش‌گر تحت پیش‌بر SCSV1 از ویروس Subclover stunt virus در آن تعبیه شده است. این پیش‌بر مانند پیش‌بر 35S در همه‌ی اندام‌های گیاهی بیان می‌شود و به عنوان یک پیش‌بر عمومی محسوب می‌شود ولی نحوه‌ی عملکرد آن بهتر از 35S می‌باشد. ژن *nptII* به همراه پیش‌بر و ترمیناتور آن در یک T-DNA جداگانه درون این پلاسمید تعبیه شده است. این پلاسمید دارای ژن *cry1Ac* با توالی سنتزی می‌باشد که تحت پیش‌بر SSU که از آرابیدوپسیس جداسازی شده است، کلون گردیده است. این پیش‌بر قادر است ژن پایین‌دستی خود را تنها در بافت‌های سبز گیاه مانند برگ، ساقه، غلاف و کاسبرگ بیان نماید و از آنجایی که آفت *H. armigera* عموماً به بافت‌های سبز گیاه مانند غلاف‌ها حمله می‌کند، بنابراین بیان آن در بافت‌های سبز گیاه می‌تواند از حمله آفت جلوگیری کند. بدین ترتیب یک پلاسمید حاوی دو T-DNA جداگانه (pBK101) که دارای یک توالی تغییریافته از ژن *cry1Ac* و *nptII* به عنوان یک ژن گزینش‌گر می‌باشد، استفاده شده است (شکل ۱). پلاسمید مضاعف نیز با استفاده از الکتروپوراسیون به درون آگروباکتریوم تومی فاشینس نژاد AGL1 فرستاده شده است.

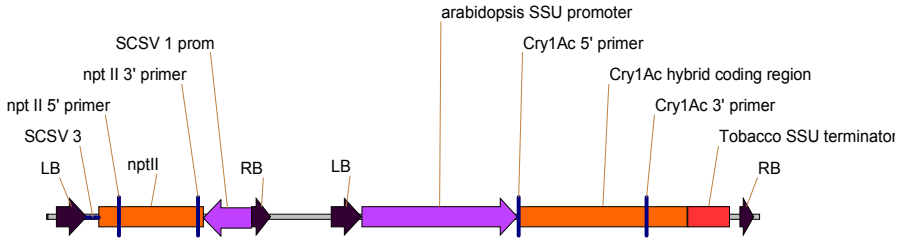
تهیه ریزنمونه و هم‌کشتی

برای تولید نخود تراریخته Bt از واریته Jimbour استفاده گردید. در این تحقیق حدود ۵۵۰۰ بذر استریل برای تهیه ۱۱۰۰۰ ریزنمونه از برش‌های طولی محور جنینی به همراه لپه‌ها جهت هم‌کشتی استفاده شد. برای کشت آگروباکتریوم از محیط کشت MG/L حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین استفاده و به صورت شبانه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد تا OD[1] مورد نیاز باکتری که بین ۰/۵ تا یک باشد را تأمین نماید. ریزنمونه‌های آماده به مدت ۴۵ دقیقه درون محلول آگروباکتریوم قرار گرفت و سپس بر روی کاغذ صافی در محیط هم‌کشتی شامل محیط کشت B5 به همراه ۱۰ میلی‌مولار MES[2]، یک میلی‌گرم در لیتر NAA، یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱۰۰ میکرومولار از کونیفریل الکل قرار داده شد. محیط کشت حاوی ریزنمونه‌ها در اتاق رشد با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۶/۸ (تاریکی/روشنایی) به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد.

شاخه‌زایی

پس از سه روز ریزنمونه‌ها به محیط کشت انتخابی و باززایی که شامل محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin ، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۱۰ میلی‌مولار MES، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر تیمنتین (محیط کشت RS) با pH معادل ۵/۸ بود، انتقال یافتند و درصد ظهور شاخه پس از دو هفته اندازه‌گیری شد. ریزنمونه‌ها به مدت دو هفته نیز در محیط کشت انتخابی بعدی شامل MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin، ۱۰ میلی‌مولار MES، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر تیمنتین (محیط کشت SS) و pH معادل ۵/۸ منتقل شدند. سپس شاخه‌های باقیمانده چندین دوره در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر Kin، ۱۰ میلی‌مولار MES، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر تیمنتین (محیط کشت TS) واکشت شدند.

[1] Optical density
[2] 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid



شکل۱- قطعه ژنی حاوی دو ژن *nptII* و *cry1Ac* در دو T-DNA مجزا

Fig. 1. Gene cassette containing *nptII* and *cry1Ac* genes in two separate T-DNA

ریشه‌زایی و سازگاری

برای ریشه‌زایی شاخه‌های تولید شده از سه محیط کشت B5 حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA (MR)، ۰/۵ MB (نصف غلظت نمک‌های محیط کشت MS و ویتامین‌های محیط کشت B5) حاوی دو میلی‌گرم در لیتر IBA (MY) و محیط کشت کامل MB حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از IAA استفاده شد. سپس شاخه‌های ریشه‌دار شده که طول ریشه‌ی آنها بیش از یک سانتی‌متر بود به خاک سبک حاوی نسبت مساوی از ماسه: مواد آلی: پرلیت (۱:۱:۱) انتقال داده شدند. از ظروف شفاف پلاستیکی برای حفظ رطوبت گیاهچه‌ها استفاده شد. به‌تدریج مقدار رطوبت کم شده و بر مقدار نور افزوده شد. گیاهان پس از مدتی به گلخانه و سپس به گلدان‌های بزرگ‌تر منتقل شدند.

تجزیه و تحلیل PCR

حضور ژن‌های *cry1Ac* و *nptII* در گیاهان تراریخته با استفاده از PCR تأیید شد. به این منظور ابتدا DNAی ژنومی به روش Soltis Lab CTAB DNA Extraction (Doyle & Doyle, 1987; Cullings, 1992) از برگ جوان و تازه بازشده از گیاهان هشت هفته‌ای در گلخانه، استخراج شد. پس از تعیین غلظت نمونه‌ها، ۵۰ نانوگرم از DNAی مورد نظر برای تجزیه و تحلیل PCR به ترتیب با آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *cry1Ac* (5′-GACACAATGGACAACAACCCAAA-3′ و 5′-TCACTGCAGGGATTTGAGTAATA-3′) *nptII* (5′-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3′ و 5′-GGCTATTCGGCTATGACTG-3′) مورد استفاده قرار گرفت. PCR با آغازگرهای *cry1Ac* منجر به تکثیر یک قطعه ۱۴۷۳ جفت بازی و با آغازگرهای *nptII* منجر به تکثیر قطعه ۸۸۷ جفت بازی گردید. علاوه بر DNAی گیاهان تراریخته از شاهدهای مناسب شامل DNAی گیاهان غیرتراریخته، واکنش PCR بدون DNA و یک واکنش با DNAی پلاسمیدی استفاده شد تا کنترل‌های مناسب در حین آزمایش انجام شود. دمای اتصال برای ژن *cry1Ac* و ژن *nptII* به ترتیب ۵۹ و ۵۸ درجه سانتی‌گراد بود.

ارزیابی دات بلاتینگ *nptII*

یکی از روش‌های ارزیابی بیان ژن *nptII*، تعیین حضور و یا عدم حضور آنزیم نئومایسین فسفوترانسفراز در گیاهان تراریخته می‌باشد. آزمون ارزیابی دات بلاتینگ *nptII* یکی از روش‌های اندازه‌گیری بیان این آنزیم در بافت‌های سبز گیاهی با استفاده از مواد رادیواکتیو و سوبسترای این آنزیم (نئومایسین) است. استخراج پروتئین از برگ‌های جوان و سپس آزمون ارزیابی با استفاده از روش مک‌دانل (McDonnell *et al.*, 1987) انجام گرفت.

وسترن بلاتینگ

گیاهچه‌هایی که به گلخانه انتقال یافتند، پس از چهار هفته به منظور تأیید حضور و بیان پروتئین *Cry1Ac* مورد ارزیابی وسترن بلاتینگ قرار گرفتند. به این منظور ابتدا استخراج پروتئین بافت برگ از برگ‌های جوان و توسعه‌یافته انجام گرفت و سپس غلظت کل پروتئین در هر نمونه با روش برادفورد (Bradford, 1976) اندازه‌گیری شد. ۵۰ میکروگرم از پروتئین بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید بارگذاری گردید و سپس

لکه‌گذاری بر روی غشای نیتروسلولزی و واکنش با آنتی‌بادی بر اساس روش وسترن بلاتینگ انجام گردید.

ارزیابی زیستی[1]

برای بررسی تأثیر بیان پروتئین Bt بر رشد لارو آفت *H. armigera*، از برگ گیاهان ۳۰ روزه برای آزمون زیست‌سنجی استفاده شد. برای این آزمون از لارو Neonate (یک تا ۱۸ ساعت عمر) از کلونی که در آزمایشگاه با رژیم غذایی مصنوعی نگهداری شده بودند (Olsen & Daly, 2000) استفاده شد. ۱۶ تا ۳۲ لارو برای هر لاین مورد ارزیابی قرار گرفت. هر ارزیابی شامل دو شاهد یکی لارو با رژیم غذایی مصنوعی و دیگری لارو با گیاه غیرتراریخته بود. میزان مرگ و میر و درصد بقای لاروها بعد از هفت روز مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

تشکیل شاخه‌های تراریخته و ریشه‌زایی

۵۸ درصد ریزنمونه‌ها پس از دو هفته شروع به شاخه‌زایی نمودند. منتهی هر ریزنمونه تقریباً بین ۵ تا ۱۰ شاخه تولید نمود که اکثر شاخه‌ها در همان مراحل اولیه کشت و یا در واکشت‌های بعدی به‌تدریج از بین رفتند و تنها تعداد محدودی از شاخه‌ها به محیط کشت TS و ریشه‌زایی منتقل شدند. در نهایت پس از واکشت‌های مکرر، ۶۲۴ شاخه به محیط کشت‌های ریشه‌زایی منتقل گردید. شاخه‌های به‌دست آمده در مرحله اول به محیط کشت ریشه‌زایی MR حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین منتقل شدند. اما پس از سه هفته تنها دو شاخه از ۵۴ شاخه منتقل شده، ریشه تولید کردند که پس از چندین روز ریشه‌ها قهوه‌ای شده و از بین رفتند. به همین دلیل کانامایسین از محیط کشت MR حذف شد و ۱۳۲ شاخه در مرحله بعد به محیط کشت MR و بدون کانامایسین منتقل شدند. منتهی از ۱۳۲ شاخه منتقل شده به محیط کشت MR تنها یک شاخه تولید ریشه نمود و درصد ریشه‌زایی در این محیط کشت کمتر از یک‌درصد بود که نشان‌دهنده‌ی نامناسب بودن این محیط کشت برای ریشه‌زایی شاخه‌ها است. لیکن درصد ریشه‌زایی در دو محیط کشت دیگر تقریباً یکسان بود. درصد ریشه‌زایی در دو محیط کشت MY و IAA برابر ۳۷ درصد بود که گویای مناسب بودن هر دو محیط کشت برای ریشه‌زایی است. نتایج این بخش نشان داد که محیط کشت ترکیبی حاوی نمک‌های محیط کشت MS و ویتامین‌های محیط کشت B5 برای ریشه‌زایی مناسب‌تر از کاربرد محیط کشت B5 به تنهایی است. علاوه بر این، وجود کانامایسین برای تشکیل ریشه نامطلوب است.

اگرچه درصد ریشه‌زایی در دو محیط کشت MY و IAA برابر بود ولی مورفولوژی ریشه‌ها در این دو محیط کشت متفاوت بود به‌طوری که ریشه‌ها در محیط کشت IAA، بلند، باریک و با تعداد محدود بودند در حالی که ریشه‌ها در محیط کشت MY به صورت متراکم و فشرده بوده و قطر ریشه زیاد ولی طول ریشه بسیار کوتاه بود و استقرار بعدی آنها در خاک، کمتر بود (شکل ۲) به‌طوری که از ۱۰۳ شاخه‌ی ریشه‌دار شده در محیط کشت MY، تنها ۲۴ شاخه یعنی حدود ۲۰ درصد در گلخانه استقرار یافتند در حالی که از ۱۰۲ شاخه ریشه‌دار شده در محیط کشت IAA، حدود ۷۷ شاخه یعنی ۶۲ درصد آنها در گلخانه استقرار یافتند.

بنابراین از کل شاخه‌های منتقل‌شده به محیط کشت‌های مختلف ریشه‌زایی، تنها ۳۳ درصد ریشه‌دار شدند و از بین این شاخه‌های ریشه‌دار شده حدود ۵۰ درصد در گلخانه استقرار یافتند. بنابراین درصد تلفات در مراحل ریشه‌زایی و استقرار در گیاه نخود، بالا است و همین موضوع، درصد باززایی و تراریزش را در مراحل نهایی کاهش می‌دهد.

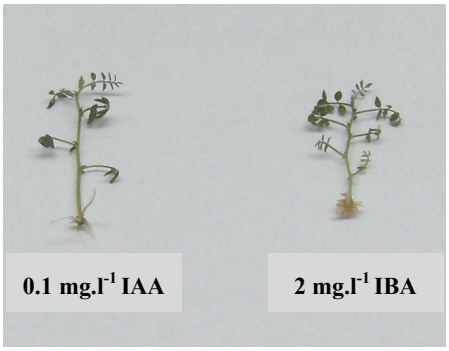
تجزیه و تحلیل PCR

تجزیه و تحلیل مولکولی PCR در گیاهان به‌دست آمده به منظور تأیید حضور و یا عدم حضور ژن‌های *nptII* و *cry1Ac* انجام شد. نتایج تجزیه و تحلیل PCR نشان داد که در تمام گیاهان بیان‌کننده این دو ژن، توالی ژن‌های مورد نظر نیز تکثیر شد. شواهد نشان داد که در ۳۶ گیاه، هر دو ژن *nptII* و ژن *cry1Ac* قرار دارد و دو گیاه نیز به‌تنهایی دارنده ژن *nptII* بودند (شکل‌های ۳ و ۴). در ۳۶ گیاه، هر دو ژن حضور داشت که بر اساس نتایج آزمایش‌های بعدی در برخی به‌تنهایی ژن *nptII* و در برخی به‌تنهایی ژن *cry1Ac* و در برخی، هر دو بیان شدند. تصاویری از باندهای تکثیریافته مربوط به ژن *cry1Ac* (شکل۳) و ژن *nptII* (شکل۴) در برخی لاین‌های به‌دست آمده نشان داده شده است.

ارزیابی دات بلاتینگ *nptII*

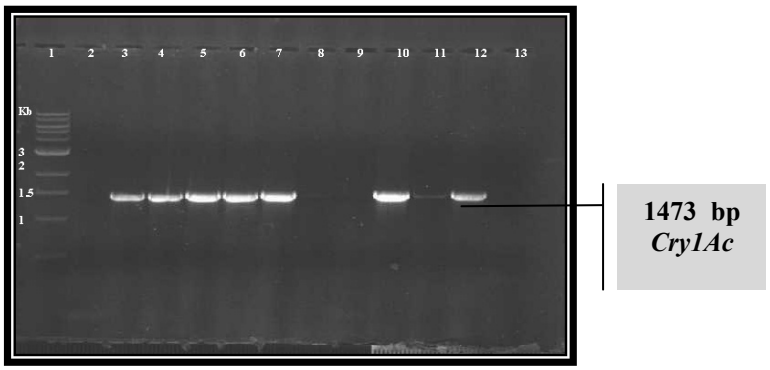
از کل ۱۰۱ گیاه استقرار یافته در گلخانه، حدود ۷۶ گیاه پس از شِش هفته بقاء یافتند و از این تعداد تنها در ۳۵ نمونه این آنزیم بیان گردید و لکه‌های پُررنگی را بر روی فیلم ظاهر نمود (شکل۵). مجاورت غشا با فیلم به مدت ۱۲ساعت مناسب بود.

[1] Bioassay



شکل۲- تفاوت در مورفولوژی ریشه‌ی تولیدشده در محیط کشت MY و IAA

Fig. 2. Morphological difference of produced roots in MY and IAA media

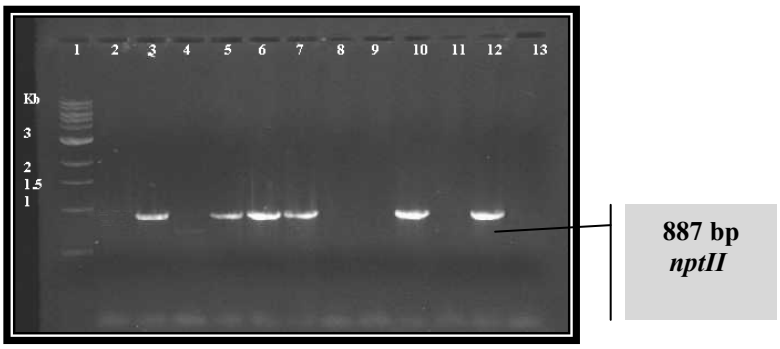


شکل ۳- تکثیر قطعه ۱۴۷۳ جفت بازی مربوط به ژن *cry1Ac*

۱) سایز مارکر، ۲) آب، ۳ تا ۱۱) لاین‌های مشکوک به تراریخته: ۳) E17-C، ۴) E11-U، ۵) E3-B، ۶) E9-V-3، ۷) E7-I3، ۸) E7-F3، ۹) E17-C2، ۱۰) E11-A، ۱۱) E12-I3، ۱۲) پلاسمید *pcry1Ac-nptII*، ۱۳- شاهد غیرتراریخته

Fig. 3. Amplification of 1473 bp fragment for *cry1Ac* gene

1) size marker, 2) water, 3-11) transgenic putative lines: 3) E17-C, 4) E11-U, 5) E3-B, 6) E9-V-3, 7) E7-I3, 8) E7-F3, 9) E17-C2, 10) E11-A, 11) E12-I3, 12) *pcry1Ac-nptII* plasmid, 13) non-transgenic plant



شکل ۴- تکثیر باند ۸۸۷ جفت بازی مربوط به ژن *nptII*

۱) سایز مارکر، ۲) آب، ۳ تا ۱۱) لاین‌های مشکوک به تراریخته: ۳) E17-C، ۴) E11-B، ۵) E3-B، ۶) E9-V-3، ۷) E7-I3، ۸) E7-F3، ۹) E17-C2، ۱۰) E11-A، ۱۱) E12-I3، ۱۲) پلاسمید *pCry1Ac-nptII*، ۱۳) شاهد غیرتراریخته

Fig. 4. Amplification of 887 bp fragment for *nptII* gene

1) size marker, 2) water, 3-11) transgenic putative lines: 3) E17-C, 4) E11-B, 5) E3-B, 6) E9-V-3, 7) E7-I3, 8) E7-F3, 9) E17-C2, 10) E11-A, 11) E12-I3, 12) *pcry1Ac-nptII* plasmid, 13) non-transgenic plant

وسترن بلاتینگ پروتئین Cry

پس از انتقال مقدار مساوی پروتئین بر روی ژل، انتظار می‌رود که شدت رنگ باند در وسترن بلاتینگ، تعیین‌کننده‌ی میزان بیان پروتئین Cry1Ac در گیاهان تراریخته باشد. پس از انتقال پروتئین بر روی غشاء، رنگ‌آمیزی غشاء با آمیدوبلک[1] انجام گرفت تا از انتقال کامل پروتئین‌ها بر روی غشاء اطمینان حاصل شود. در صورتی که پروتئین‌ها به‌طور کامل انتقال نیافته و شدت باند رابیسکو[2] در همه لاین‌ها یکی نبود، ژل‌گذاری تکرار می‌شد. در شکل ۶-A، تصویری از رنگ‌آمیزی غشای نیتروسلولزی پس از لکه‌گذاری و رنگ‌آمیزی با آمیدوبلک نشان داده شده است. باند میانی و پُررنگ مربوط به آنزیم رابیسکو است که به مقدار فراوان در بافت‌های سبز گیاهی یافت می‌شود. وسترن بلاتینگ برای تمام لاین‌ها انجام گرفت که در شکل ۶-B تصویری از ظهور باند پروتئینی ۶۰ کیلودالتونی Cry1Ac بر روی غشای نیتروسلولزی پس از واکنش با آنتی‌بادی آورده شده است.

بر اساس نتایج وسترن بلاتینگ، از ۷۶ گیاه به‌دست آمده در گلخانه، تنها در ۳۰ گیاه پروتئین Cry1Ac بیان شد ولی میزان بیان این پروتئین، متفاوت بود. ۱۹ گیاه دارای بیان ضعیف، شش گیاه دارای بیان متوسط و پنج گیاه با بیان بالا بودند. البته انتظار می‌رود که در تمامی این گیاهان، ژن *nptII* نیز بیان شود زیرا همه‌ی آنها از طریق گزینش در محیط کشت حاوی کانامایسین به‌دست آمده‌اند. طبق شواهد به‌دست آمده، از این ۳۰ گیاه در ۲۵ گیاه هر دو ژن *nptII* و *cry1Ac* بیان شد ولی در پنج گیاه باقیمانده، تنها ژن *cry1Ac* بیان شد و ژن *nptII* بیان نشده و خاموش شده بود. با احتساب ۳۸ گیاه تراریخته حاوی ژن *nptII* مقدار درصد تراریزش برابر ۰/۳۷ درصد بود و چون در ۳۶ گیاه هر دو ژن با یکدیگر انتقال یافتند بنابراین درصد انتقال همزمان[3] دو T-DNA، برابر ۹۵ درصد بوده است.

تجزیه و تحلیل گیاهان T1

تعداد زیادی از گیاهان نسل T0 از رشد ضعیفی برخوردار بوده و بذری تولید نکردند. برخی نیز با وجود ظاهری مناسب به مرحله بذردهی وارد نشدند. از بین ۳۶ گیاه تراریخته حاوی هر دو ژن، تنها هفت گیاه به بذر رفته و نسل T1 را تولید نمودند. در جدول ۱، نام لاین‌ها، تعداد بذور به‌دست آمده در نسل T1، نتیجه وسترن بلاتینگ نمونه‌ها برای تأیید بیان ژن *cry1Ac* و همچنین تعداد گیاهان به‌دست آمده، آورده شده است.

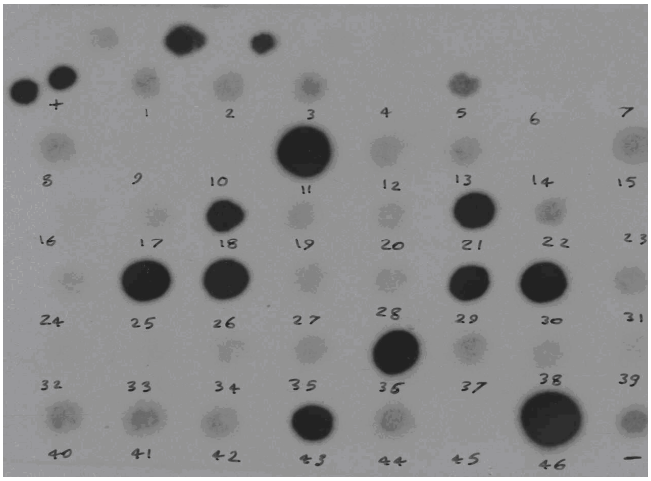
همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود تنها در یک لاین (E7-A-1.1) ژن *cry1Ac* وارد شده و بیان شده است اما این ژن در دیگر لاین ها وارد نشده است.

علاوه بر این، از لاین E7-A-1.1 برای تغذیه لارو آفت پیله‌خوار استفاده شد تا تأثیر بیان ژن *cry1Ac* بر میزان مرگ‌ومیر این حشره مشخص شود. در این ارزیابی از لاین تراریخته، شاهد غیرتراریخته و رژیم مصنوعی برای تغذیه ۳۲ لارو در هر رژیم غذایی استفاده شد. نتایج این بررسی از نظر تعداد لارو مرده و بقایافته پس از هفت روز در جدول ۲ آمده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود لاین تراریخته‌ی E7-A-1.1 توانست باعث ۱۰۰ درصد مرگ‌ومیر در لارو این آفت شود و آن را پس از هفت روز از بین ببرد.

همان‌گونه که نتایج این بررسی نشان داد، میزان تراریزش در گیاه نخود بسیار پایین است و نتایج این آزمایش، دال بر سرسخت بودن حبوبات از جمله نخود برای باززایی و تراریزش می‌باشد. اگرچه تلاش‌های متعددی برای بهینه‌سازی باززایی و تراریزش در گیاه نخود انجام گرفته است ولی میزان باززایی و تراریزش، بستگی بالایی به ژنوتیپ و شرایط محیط کشت دارد (Kar *et al.*, 1996; Krishnamurthy *et al.*, 2000; Polowick *et al.*, 2004; Sanyal *et al.*, 2005; Yousefiara *et al.*, 2008). ولی به هر حال در تمام تحقیقات انجام شده تاکنون، درصد تراریزش از پنج درصد بیشتر نبوده است (Senthil *et al.*, 2004). از طرفی دستورالعمل‌های موجود، قابلیت تکرارپذیری بالایی ندارند. یکی از مشکلات اصلی در باززایی نخود، بحث ریشه‌زایی و استقرار نامطلوب گیاهچه‌ها در شرایط گلخانه است. با توجه به این که درصد ریشه‌زایی در شرایط این‌ویترو در اکثر تحقیقات انجام شده بسیار پایین بوده است (Sarma *et al.*, 2004)، لذا تغییر روش این‌ویترو برای ریشه‌زایی و استقرار بهینه گیاهان باززایی شده در شرایط گلخانه توصیه می‌شود.

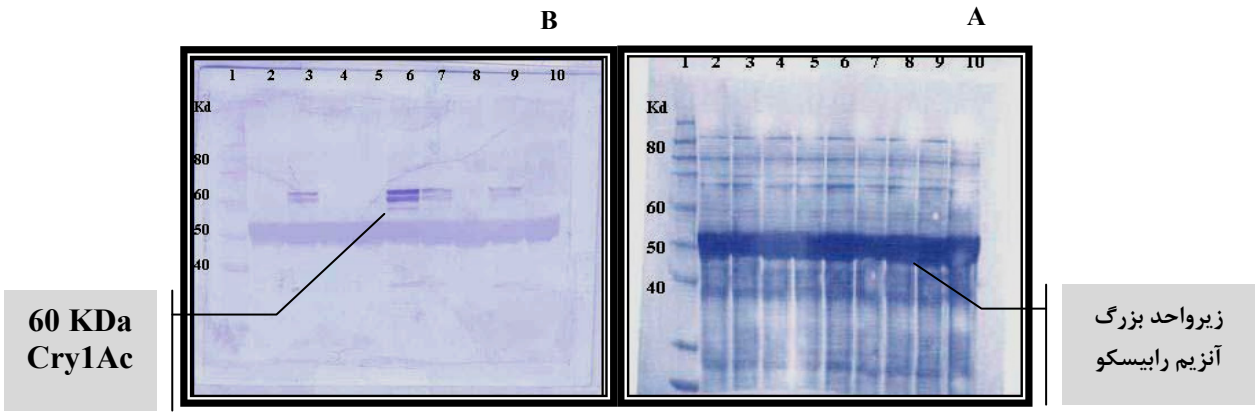
علاوه بر این، شواهد نشان داده که کاربرد کانامایسین در محیط کشت تشکیل ریشه در نخود، تأثیری منفی داشته است. در این بررسی نیز در ابتدا در محیط کشت ریشه‌زایی MR از کانامایسین استفاده شد ولی هیچ‌کدام از شاخه‌ها، ریشه‌ای تولید نکردند و یا در صورت ریشه‌زایی، در مراحل اولیه از بین رفتند. لذا کانامایسین از محیط کشت ریشه‌زایی حذف شد. سایر محققانی که نخود تراریخته تولید کرده‌اند، در محیط کشت ریشه‌زایی از کانامایسین استفاده نکرده‌اند.

[1] Ammido black
[2] Rubisco
[3] Cotransformation



شکل ۵- دات بلاتینگ *nptII* در گیاهان مشکوک به تراریخته

Fig .5. *nptII* Dot blotting in transgenic putative lines



شکل ۶- A) انتقال صحیح پروتئین‌ها به غشای نیتروسلولزی پس از رنگ‌آمیزی با آمیدوبلک

B) ظهور باند پروتئینی ۶۰ کیلودالتونی Cry1Ac بر روی غشای نیتروسلولزی

۱) سایزماکر، ۲) شاهد غیرتراریخته، ۳) E9-K2، ۴) E8-J، ۵) E9-DD، ۶) E7-A-2، ۷) E7-H، ۸) E9-V-1، ۹) E11-R-1، ۱۰) E6-G3

Fig. 6. A) Correct transferring of proteins on nitrocellulose membrane after staining with ammido black
B) Detection of 60 Kd protein band on nitrocellulose membrane
1) size marker, 2) non-transgenic plant, 3) E9-K2, 4) E8-J, 5) E9-DD, 6) E7-A-2, 7) E7-H, 8) E9-V-1, 9) E11-R-1, 10) E6-G3

جدول ۱- نتایج تجزیه و تحلیل وسترن بلاتینگ در نسل T1

(تعداد مثبت‌ها نشان‌دهنده‌ی میزان بیان پروتئین Cry1Ac می‌باشد)

Table 1. Western blotting analysis in T1 generation

(the number of positives show the expression level of Cry1Ac protein)

تعداد نمونه‌های با وسترن بلاتینگ مثبت در نسل T1 No. of samples with positive western blotting in T1 generation	تعداد گیاهان تست شده در نسل T1 No.* of tested plants in T1 generation	وسترن بلاتینگ در نسل T0 Western blotting in T0 generation	لاین Line
1	2	++++	**E7-A-1**
0	8	++++	**E7-A-2**
0	4	+++	**E7-I3**
0	2	++	**E9-K2**
0	6	++	**E15-C-4/3**
0	10	+	**E11-U**
0	6	+	**E17-C**

* No.: Number

جدول ۲- نتایج ارزیابی زیستی لاین تراریخته E7-A-1.1 در تغذیه لارو آفت پیله‌خوار

Table 2. Bioassay results of E7-A-1.1 transgenic line in feeding of *Helicoverpa armigera* larva

میانگین درصد مرگ و میر Mean of mortality percent	تعداد لارو No. of larva		نوع تغذیه Feeding type	
	بقاءیافته Survival	مرده Dead		
6 ±3.4	30	2	Artificial diet	رژیم مصنوعی
31 ±4.4	22	10	non-transgenic line	لاین غیرتراریخته
100	0	32	transgenic line	لاین تراریخته

Fontana *et al.*, (1993) از محیط کشت MS به اضافه غلظت پایینی از IAA و Kin برای ریشه‌زایی شاخه‌های تراریخته استفاده کرده و ۵۰ درصد ریشه‌زایی را گزارش نمودند. درصد تراریزش در بررسی آنها چهار درصد برآورد گردید. آنها در بررسی خود نشان دادند که کاربرد کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت ریشه‌زایی به شدت مانع ریشه‌زایی شده است. لذا کانامایسین را از محیط ریشه‌زایی خود حذف کردند. در مطالعه‌ای ابتدا شاخه‌ها به محیط کشت ریشه‌زایی حاوی کانامایسین منتقل شد ولی بلافاصله پس از ظهور نوک ریشه، آنها را به محیط کشت ریشه‌زایی بدون کانامایسین منتقل نمودند زیرا وجود کانامایسین مانع رشد ریشه می‌شود (Polowick *et al.*, 2004).

درصد تراریزش در بررسی‌های متعدد بسیار متنوع بوده است و می‌توان بیان داشت که در همه تحقیقات، درصد تراریزش پایین بوده است و اختلاف جزئی آنها به خاطر نوع ژنوتیپ به‌کار رفته، نژاد آگروباکتریوم، نوع ریزنمونه و ژن گزینش‌گر بوده است و همین عوامل، تکرارپذیری روش‌های به‌کار گرفته شده توسط محققان مختلف را کاهش می‌دهد. در گزارش‌های مختلف، درصد تراریزش نخود بین یک تا ۱/۵ درصد (Kar *et al.*, 1996)، ۱/۱۲ درصد (Sanyal *et al.*,

2005)، ۳/۱ درصد (Polisetty *et al.*, 1997) و حدود پنج درصد (Senthil *et al.*, 2004) برآورد شده است.

علاوه بر این، کاربرد کانامایسین به عنوان یک عامل گزینشی برای انتخاب گیاهان تراریخته در نخود نامناسب است. زیرا این آنتی‌بیوتیک برای گزینش گیاهان به صورت قوی عمل نمی‌کند و راندمان پایینی دارد. در این تحقیق میزان فرار، حدود ۵۰ درصد تخمین زده شد و همین موضوع حجم کار را در نهایت افزایش داده و سبب کار اضافی بر روی گیاهان غیرتراریخته گردید. درصد فرار گیاهان غیرتراریخته خصوصاً زمانی که از روش باززایی مستقیم استفاده شود، افزایش می‌یابد. لذا یا باید میزان دوره‌های گزینش را افزایش داد و یا این‌که غلظت بالاتر کانامایسین استفاده شود که البته گزینه دوم توصیه نمی‌شود زیرا با افزایش غلظت، حالت سمیت پیدا کرده و تأثیر نامطلوبی بر روی رشد و مورفولوژی گیاهان تراریخته و غیرتراریخته خواهد داشت. بنابراین می‌توان تعداد واکشت‌ها را افزایش داد. ولی این گزینه نیز آن‌قدر مؤثر نخواهد بود زیرا تجارب مختلف نشان داده که قرار گرفتن بیش از حد شاخه‌ها و نمونه‌های گیاهی در شرایط این‌ویترو سبب کاهش درصد باززایی در مراحل بعدی و استقرار ضعیف گیاهان در شرایط این‌ویوو خواهد شد (Bajaj, 1990). از طرفی کانامایسین با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به سرعت قادر به از بین بردن شاخه‌های غیرتراریخته نیست به‌طوری که در اکثر واکشت‌ها، شاخه‌ها در قسمت پایین به رنگ سفید تا رنگ سبز پریده بوده و در قسمت بالا کاملاً سبز و رشدی بسیار مناسب داشتند و باید شاخه‌ها مجدداً برش داده شده و به محیط جدید انتقال یابند. تولید شاخه‌های شیمر نخود در محیط کشت گزینشی حاوی کانامایسین و از طریق روش باززایی مستقیم نیز گزارش شده است (Kar *et al.*, 1996). لذا بهتر است از عامل گزینش دیگری به جای آنتی‌بیوتیک کانامایسین استفاده شود که در یک دوره کوتاه‌تر و با کارآیی بیشتر شاخه‌های تراریخته را گزینش نماید.

در این طرح دو ژن *cry1Ac* و *nptII* در دو T-DNA مجزا از یکدیگر درون پلاسمید وارد شده بودند و هدف از آن حذف ژن نشان‌گر در گیاهان تراریخته در نسل‌های بعدی بوده است. اساس این روش برای حذف ژن نشان‌گر بر مبنای تفرق صفات در نسل‌های بعد و احتمال کراسینگ‌اور بین این دو T-DNA در نسل‌های بعد می‌باشد. بنابراین انتظار می‌رود که در نسل‌های بعد بتوان به گیاهانی دست یافت که تنها حاوی ژن مورد نظر ما بوده و ژن گزینش‌گر در آن وجود نداشته باشد. از آنجایی که این دو ژن در دو T-DNA مجزا در ساختار پلاسمید استفاده شده بودند انتظار می‌رود که درصد تراریزش نسبت به تحقیقات دیگر، پایین‌تر باشد زیرا تعدادی از گیاهان که تنها حاوی ژن *cry1Ac* بودند، به علت عدم داشتن ژن مقاوم، بقا نمی‌یابند. بنابراین درصد تراریزش در اصل، یک مقدار واقعی از توانایی آگروباکتریوم برای تراریزش نخود نمی‌باشد. علاوه بر این، درصد پایین ریشه‌زایی و استقرار نامطلوب گیاهان سبب کاهش درصد تراریزش در این بررسی شده است. نتایج بررسی محققان دیگری که نخود تراریخته حاوی ژن *cry1Ac* را تولید کرده‌اند نشان داده که بیان این پروتئین در مقادیر بالا توانسته سبب ۱۰۰ درصد مرگ‌ومیر در جمعیت حشره شود (Kar *et al.*, 1997; Sanyal *et al.*, 2005). لذا با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان امیدوار بود که در نسل‌های بعدی بتوان به لاین‌های هموزیگوس با مورفولوژی مناسب و تأثیر بالا بر مرگ‌ومیر حشره دست یافت. البته نتایج ارزیابی زیستی نیز این موضوع را تأیید نمود.

سپاس‌گزاری

لازم است در این تحقیق از مرکز تحقیقاتی CSIRO در استرالیا و جناب آقای دکتر هیگینز و همکاران ایشان به خاطر فراهم آوردن امکان انجام این تحقیق و راهنمایی‌های ارزنده ایشان کمال سپاس و تشکر را داشته باشم.

منابع

1. Bajaj, Y.P.S. 1990. Biotechnology in Agriculture and Forestry 10: Legumes and Oilseed Crops I. New Delhi. India, p. 100-113.
2. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
3. Cullings, K.W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. Mol. Eco. 1: 233-240.
4. Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin 19: 11-15.
5. Fontana, G.S., Santini, L., Caretto, S., Frugis, G., and Mariotth, D. 1993. Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L. (chickpea). Plant Cell Rep. 12: 194-198.

6. Kar, S., Johnson, T.M., Nayak, P., and Sen, S.K. 1996. Efficient transgenic plant regeneration through *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Rep. 16: 32-37.
7. Kar, S., Basu, D., Das, S., Ramkrishnan, N.A., Mukherjee, P., Nayak, P., and Sen, S.K. 1997. Expression of *cryIA(c)* gene of *Bacillus thuringiensis* in transgenic chickpea plants inhibits development of pod-borer (*Heliothis armigera*) larvae. Transgenic Res. 6: 177-185.
8. Krishnamurthy, K.V., Suhasini, K., Sagare, A.P., Meixner, M., Dekathen, A., Pikardt, T., and Schieder, O., 2000. *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) embryo axes. Plant Cell Rep. 19: 235-240.
9. McDonnell, R.E., Clark, R.D., Smith, W.A., and Hinchee, M.A. 1987. A simplified method for the detection of neomycin phosphotransferease II activity in transformed plant tissues. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 380-386.
10. Olsen, K.M., and Daly, J.C. 2000. Plant-toxin interactions in transgenic Bt cotton and their effect on mortality of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 93: 1293-1299.
11. Polisetty, R., Paul, V., Deveshvar, J.J., and Khetarpal, S. 1997. Multiple shoot induction by benzyladenine and complete plant regeneration from seed explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Rep. 16: 565-571.
12. Polowick, P.L., Balisiki, D.S., and Mahon, J.D. 2004. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.): gene integration, expression and inheritance. Plant Cell Rep. 23: 485-491.
13. Popelka, J.C., and Higgins, T.J.V. 2007. Chickpea. In: E.C. Pua and M.R. Davey (Eds.). Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol.59: Transgenic Crops IV. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
14. Sanyal, I., Singh, A.K., Kaushik, M., and Amla, D.V. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance against pod borer insect *Helicoverpa armigera*. Plant Sci. 168: 1135-1146.
15. Sarma, B.K., Moore, A., Tate, W., Molvig, L., Morton, R.L., Rees, D.P., Chiaiese, P., Chrispeels, M.J., Tabe, L.M., and Higgins, T.J.V. 2004. Transgenic chickpea seeds expressing high level of a bean α-amylase inhibitor. Mol. Breed. 14: 73-82.
16. Senthil, G., Williamson, B., Dinkins, R.D., and Ramsay, G. 2004. An efficient transformation system for chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Rep. 23: 297-303.
17. Yousefiara, M., Bagheri, A., and Moshtaghi, N. 2008. Optimizing regeneration condition in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Pakistan J. Biol. Sci. 11: 1009-1014.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 1, No. 1, 2010, p. 65-75

Genetic engineering for increasing resistance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to pod borer (*Helicoverpa armigera*)

Moshtaghi, N.[1*], Bagheri[1], A., Higgins[2], T.J., Jalali Javaran[3], M. & Ghareyazie[4], B.

1- Faculty of Agricultural College & Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad
2- Faculty of Plant Industry, CSIRO, Canberra, Australia
3- Faculty of Agricultural College, Tarbiat Modares University, Tehran
4- Faculty of Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj

Received: 13 May 2009
Accepted: 10 October 2009

Abstract

Pod borer is one of the main factors for yield decrease of chickpea. Therefore, breeding of chickpea for resistance to this pest is important. Modified *cry1Ac* gene of *Bacillus thuringiensis* in pCry1Ac-nptII plasmid containing twin T-DNA for *cry1Ac* and *nptII* genes have been used for transformation of chickpea. At last 38 plants had *nptII* gene that 36 plants of them had *cry1Ac* gene and two plants had only *nptII* gene. Western blotting analysis showed that 30 plants had Cry1Ac protein expression. Transformation percentage was 0.37 in this experiment. Only 7 plants produced T1 seeds. Regarding to western blotting and PCR analysis for T0 and T1, plants were devided to some groups with different expressions. Bioassay with neonate of pod borer showed high mortality in lines with high Cry1Ac protein expression.

Key words: Bt, Chickpea, *cry1Ac*, pod borer, transformation

[*] **Corresponding Author:** E-mail: moshtaghi@um.ac.ir, Tel.: 0511-8795616